

Treball de Fi de Grau

**Identificació de nous gens que participen en la remodelació del
sistema traqueal de *Drosophila melanogaster***

Victòria Rodríguez Marcé

Grau en Biotecnologia

Tutors: Xavier Franch, Pep Bau

Vic, juny de 2014

ÍNDEX

1. Resum	
1.1. Resum del Treball Final de Grau	Pàgina 03
1.2. Final Degree Project summary	Pàgina 04
2. Introducció	
2.1. Importància d'organismes model per estudis genètics	Pàgina 05
2.2. La morfogènesi i el sistema traqueal de <i>Drosophila melanogaster</i>	Pàgina 05
3. Objectius	Pàgina 11
4. Materials	Pàgina 11
5. Metodologia i cos del treball	
5.1. Selecció de gens candidats	Pàgina 12
5.2. Selecció dels creuaments	Pàgina 14
5.3. Generació d'un knock-out/knock-in del gen <i>Bnl</i>	Pàgina 15
6. Resultats i discussió	
6.1. Mini-cribatge de gens sobreexpressats a la tràquea per identificar aquells que participin en la remodelació del sistema traqueal de <i>Drosophila melanogaster</i>	Pàgina 18
6.2. Generació d'eines per a l'estudi de la via de senyalització <i>FGF/Bnl</i> durant la remodelació del sistema traqueal mitjançant la tècnica de <i>knock in</i>	Pàgina 23
7. Conclusions	Pàgina 23
8. Bibliografia	Pàgina 27
9. Annexes	Pàgina 29

1. RESUM:

1.1. RESUM DEL TREBALL FINAL DE GRAU

Títol: Identificació de nous gens que participen en la remodelació del sistema traqueal de *Drosophila melanogaster*.

Paraules clau: *Drosophila melanogaster*, traqueoblasts, morfogènesi, knock-out/knock-in, sistema traqueal

Autora: Victòria Rodríguez Marcè

Tutors: Xavier Franch, Pep Bau

Data: Juny de 2014

Un dels organismes model més utilitzats en experimentació genètica és la *Drosophila melanogaster* ja que la facilitat de manipulació genètica i la seva simplicitat permeten estudiar processos biològics amb múltiples aplicabilitats en diferents àmbits d'estudi com el desenvolupament embrionari i la morfogènesi.

La morfogènesi es un dels esdeveniments més importants durant el desenvolupament embrionari que permet la formació dels diferent teixits i òrgans, i que depèn de l'expressió genètica i de l'activació i coordinació de diferents vies de senyalització. Entendre com es coordinen aquest processos es fonamental per conèixer com es forma un òrgan. Així, l'objectiu principal d'aquest Treball de Final de Grau és identificar nous gens implicats en la formació del sistema traqueal (el nostre òrgan model) mitjançant un mini-cribatge funcional de gens que s'expressen en la tràquea, a més de generar eines per a l'estudi de la via de senyalització *FGF/Bnl* durant la remodelació del sistema traqueal mitjançant la tècnica de *knock in*.

Per a dur-ho a terme, amb el suport de la base de dades de Gens i Genomes de *Drosophila melanogaster* (*mod-ENCODE Tissue Expression Data*) s'han seleccionat gens candidats expressats a la tràquea en estat larvari. Un cop identificats, s'ha estudiat la seva possible funció en el desenvolupament de les tràquees mitjançant el seu silenciament amb el sistema UAS-Gal4.

Així hem vist que *Vein* (CG10491), *CG17098*, *No Ocelli* (CG4491) i *Peptidasa* (CG4017) presenten diversos fenotips que afecten la formació dels traqueoblasts. També hem vist que *Vein*, lligand de la via EGF és necessari per a la proliferació i supervivència de les cèl·lules traqueals del sac aeri.

Finalment s'ha iniciat la generació d'un *knock in* en el gen *branchless* (*bnl*). Per aquest motiu s'han amplificat les regions 5' i 3' de l'exó 2 del gen *Bnl* i s'ha iniciat la seva clonació dirigida al vector de destí pTV-Cherry. Aquesta tècnica generarà eines que permetran entendre la funció del gen *bnl* durant la remodelació del sistema traqueal.

1.2. FINAL DEGREE PROJECT SUMMARY

Title: Identification of new genes that participate in *Drosophila melanogaster* tracheal system remodeling.

Word keys: Xavier Franch, Pep Bau

Autor: Victòria Rodríguez Marcè

Tutor: *Drosophila melanogaster*, tracheoblasts, morphogenesis, knock-out/knock-in, tracheal system

Date: Juny de 2014

One of the most widely-used model organisms for genetic studies is *Drosophila melanogaster*, as it is easy to genetically manipulate and its simplicity allows for the study of biological processes with multiple applicabilities such as the study of embryonic development and morphogenesis.

Morphogenesis is one of the most important events during embryogenesis that controls organ and tissue formation. Such complicated process depends on genetic regulation and on the activation and coordination of several signaling pathways. Therefore, it is crucial to know the regulation of those processes in order to understand how an organ is formed. Thus, the main goal of this Final Degree Project is to identify new candidate genes participating in tracheal system development (our organ model) by a functional mini-screen of genes highly expressed in the trachea. Moreover, we generated tools in order to study *FGF/Bnl* signaling pathway during tracheal system remodeling.

Using the *Drosophila melanogaster's* Genes and Genomes database (*mod-ENCODE Tissue Expression Data*) several candidate genes expressed in the trachea during larval stage have been selected. We investigate the possible functions of these candidate genes by silencing them specifically in the tracheal system.

We have found that *CG17098*, *No Ocelli (CG4491)* and *Peptidase (CG4017)* genes present aberrant phenotypes in tracheoblasts formation. In addition, we found that vein, a ligand of EGF signaling promotes cell proliferation and cell survival in tracheal cells of the air sac primordium.

Finally we have started the generation of a *knock in* in *Bnl* locus. To this end we amplified 5' and 3' regions flanking exon 2 of *Bnl* gene and cloned those fragments to the destination pTV-Cherry vector. This technique will allow us to generate tools to study the role of *bnl* during tracheal system remodeling.

2. INTRODUCCIÓ

2.1. IMPORTÀNCIA D'ORGANISMES MODEL PER ESTUDIS GENÈTICS

Actualment, els estudis genètics són de vital importància per conèixer el funcionament i regulació de gens candidats i la seva participació en vies de senyalització implicades en processos cel·lulars importants com en el desenvolupament embrionari i en processos desencadenants de malalties de greu impacte per la salut humana. Aquest estudis genètics es poden realitzar sobretot gràcies a l'ús d'organismes model i amb el suport d'eines bioinformàtiques de modelització.

Un dels organismes model més utilitzats en experimentació genètica és la *Drosophila melanogaster*, comunament coneguda com a mosca de la fruita o del vinagre. No només la facilitat de manipulació genètica i les seves dimensions fan que hagi esdevingut un dels organismes model més estudiats, sinó que el seu curt cicle vital (en total 10 dies) dividit en l'embrió, tres fases larvals, pupa i adult i la seva capacitat reproductiva capaç de generar un gran nombre de descendència permeten detectar combinacions genètiques amb altes freqüències al llarg de moltes generacions. Presenta un baix nombre de cromosomes format per 3 parells de cromosomes autosòmics i un parell de cromosomes sexuals, fet que ha afavorit a què la seva configuració genètica sigui avui en dia ben coneguda, sobretot arran dels avenços en tècniques de seqüenciació massiva i exòmica que han permès identificar elements genètics clau. De fet, el 61% dels gens de malalties humanes tenen una contrapartida identificable en el codi genètic de les mosques de la fruita.

La seva simplicitat permet estudiar processos biològics que degut a la seva complexitat no poden ser estudiats en mamífers. Aquest fou el cas del gen *eyeless* de *Drosophila*, que té un gen homòleg en humans anomenat *pax6*. Quan aquest gen s'expressa en qualsevol cèl·lula indiferenciada activa una cascada genètica que acaba amb la construcció d'un ull, tant en mosques com en humans (Weasner et al, 2009).

Altres aplicacions d'utilitzar *Drosophila* com a organisme model són per exemple estudis de desenvolupament i formació sobre el seu sistema nerviós, el circulatori i el muscular així com estudis de control genètic del comportament. També es fan estudis de gens implicats en patologies de gran impacte com ara el càncer, control de la proliferació i polarització cel·lular.

2.2. LA MORFOGÈNESI I EL SISTEMA TRAQUEAL DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Un dels esdeveniments més importants durant el desenvolupament embrionari és la formació dels diferents teixits i òrgans, anomenat morfogènesi. La morfogènesi depèn de l'expressió genètica i de l'activació i coordinació de les vies de senyalització. Per estudiar com aquests processos es regulen en el nostre laboratori utilitzem el sistema traqueal *Drosophila melanogaster* com a model (**Figura 1**) (Ghabrial and Lusichig (2003))

El sistema traqueal és una xarxa tubular epitelial ramificada per tot el cos de la mosca que constitueix el sistema respiratori encarregat de l'intercanvi de gasos. Durant l'embriogènesi, el sistema traqueal es desenvolupa a partir de cèl·lules ectodèrmiques que invaginen. Un cop invaginades les cèl·lules traqueals comencen a migrar i responen a l'activació de la via de senyalització *FGF/Bnl*, formant una xarxa de tubs que transportarà l'oxigen a tots els teixits de la larva (Figura 1).

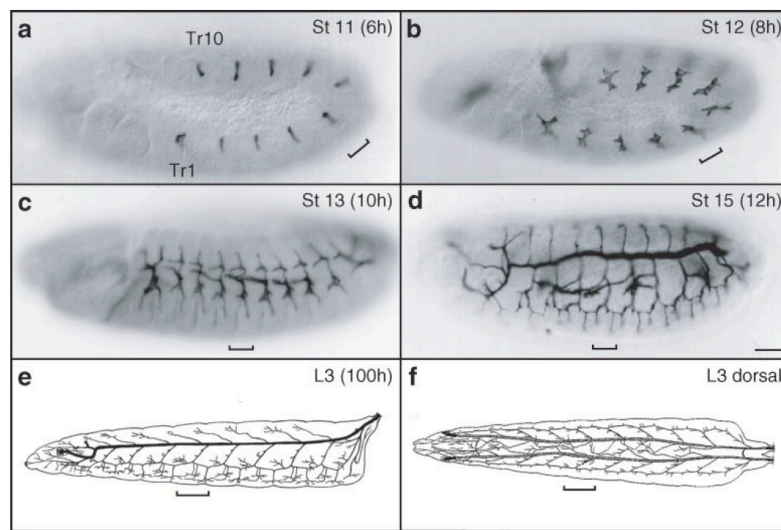


Figura 1. Sistema traqueal de *Drosophila melanogaster*. (Ghabrial and Luschig (2003))

El gen *bnl* codifica per a la proteïna fibroblast growth factor (FGF). Aquesta proteïna es secretada per cèl·lules properes a les cèl·lules traqueals on s'uneix al seu receptor *btl* activant la via de senyalització i permet la migració de les mateixes.

Durant el desenvolupament larvari de *Drosophila melanogaster* aquest mateix sistema traqueal pateix una profunda remodelació que permet la formació d'un nou sistema traqueal, primer a la pupa i després a l'adult. Aquesta remodelació es dona a través d'un grup particular de cèl·lules traqueals anomenades traqueoblasts. (Weaver and Krasnow (2008))

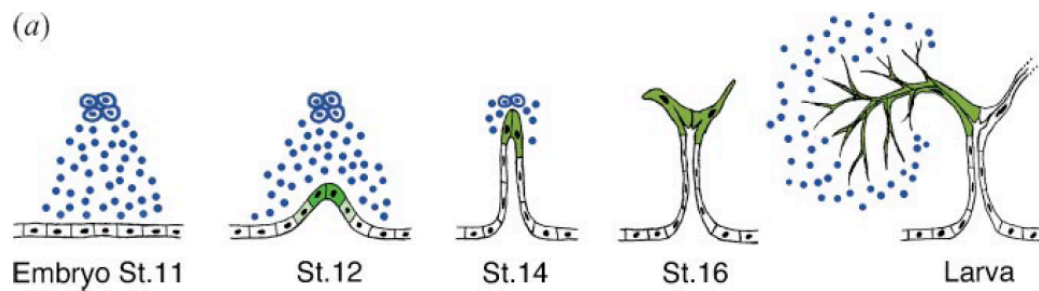


Figura 2. Activació de la via FGF durant el desenvolupament del sistema traqueal de *Drosophila melanogaster*. Bnl es secretat per cèl·lules properes a les cèl·lules traqueals on activa la via FGF que activa la migració. (Weaver and Krasnow (2008))

Existeixen tres poblacions de traqueoblasts al llarg del sistema traqueal: el segon segment traqueal (TR2) (Figura 3), les branques espiraculars dels segments traqueals 4 (TR4) i 5 (TR5) (Figura 4 i 5) i el Sac aeri del disc imaginal d'ala (Figura 6). Aquestes cèl·lules romanen quiescents fins a l'últim estadi larvari L3, on comencen a proliferar per formar la tràquea pupal. Degut a aquest comportament es pot considerar els traqueoblasts com a cèl·lules mare.

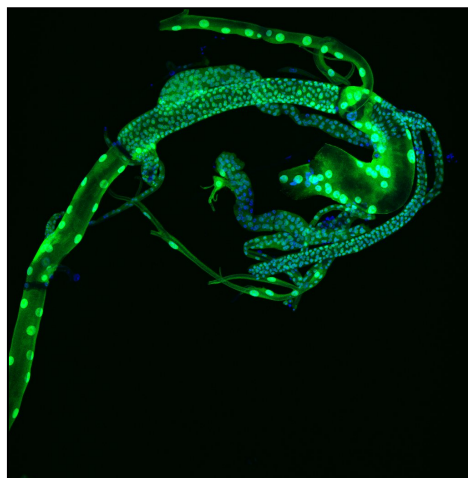


Figura 3. Observació amb microscopi de fluorescència del segment TR2 en divisió

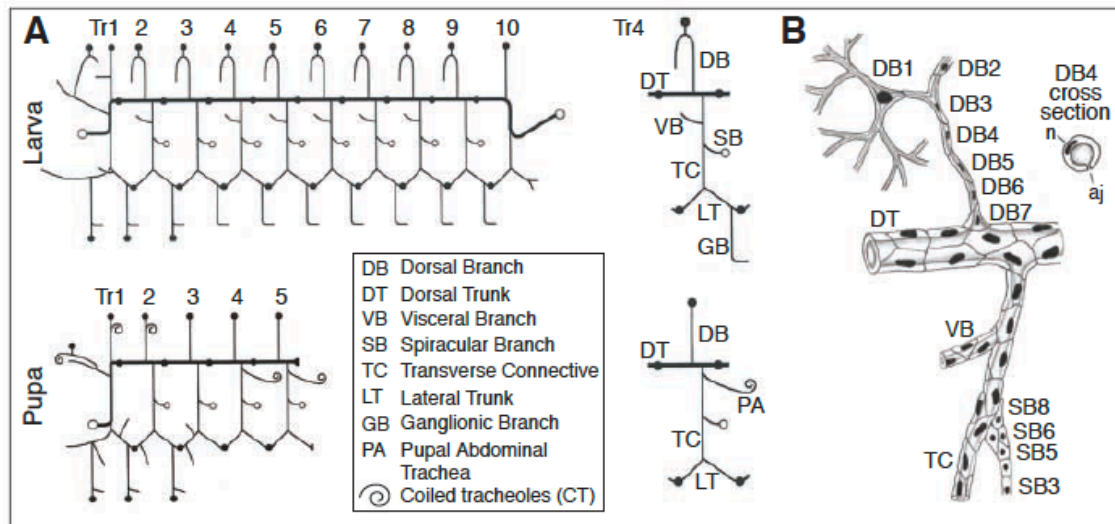


Figura 4: Organització del sistema traqueal de larva i pupa *Drosophila melanogaster*. **(A)** Es mostra l'esquema del sistema traqueal de *Drosophila melanogaster* tant en larva com en pupa. Els cercles negres mostren connexions de cèl·lules de fusió que s'uneixen amb metàmers i els cercles blancs són accessoris de l'epidermis. **(B)** Estructura cel·lular de la TR4 larval. (Weaver and Krasnow, 2008).

Les branques espiraculars es divideixen i les cèl·lules traqueals progressen cap a la part dorsal d'aquestes branques on s'acumulen (en verd) esperant la metamorfosi per formar la tràquea pupal. La proliferació d'aquestes cèl·lules es regulat per l'expressió del factor d'expressió *cut* (en vermell), tanmateix resultats preliminars del nostre laboratori indiquen que la via de senyalització *Btl/bnl* (en verd) també sembla que tenen un paper important en aquest procés. Per aquest motiu ens disposem a generar una sèrie d'eines per a l'estudi d'aquesta via de senyalització en el control de la proliferació. (Pitsouli and Perrimon, 2010)

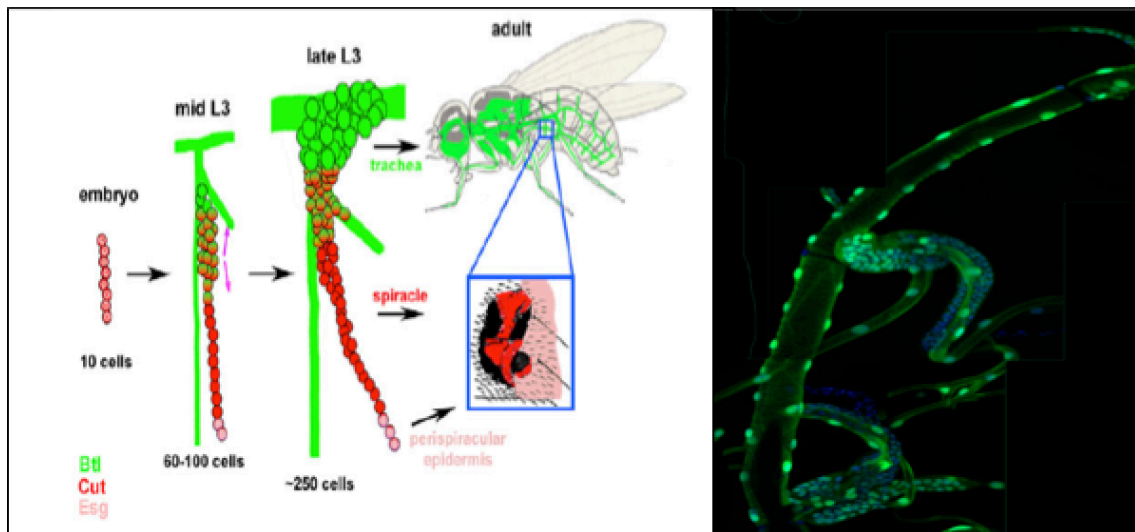


Figura 5. Model de desenvolupament dels traqueoblasts de les branques espiraculars i progressió de les cèl·lules. A la dreta, en verd, acumulació de les cèl·lules traqueals. En vermell, proliferació d'aquestes cèl·lules regulat per l'expressió del factor d'expressió *cut*. A l'esquerra, traqueoblasts observats amb el microscopi de fluorescència Zeiss.

Del sac aeri es desenvolupa durant l'últim estadi larvari a partir de cel·les traqueals que migren seguint l'expressió en el disc imaginal d'ala del gen *bnl*. Aquests primordis es desenvolupen durant l'estadi de pupa i formen en l'adult els sacs aeris que aporten oxigen a la musculatura de l'ala.

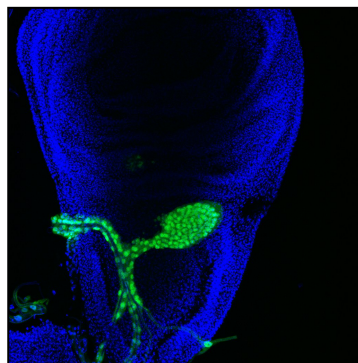


Figura 6. Disc d'ala (blau) i sac (verd) de *Drosophila melanogaster*.

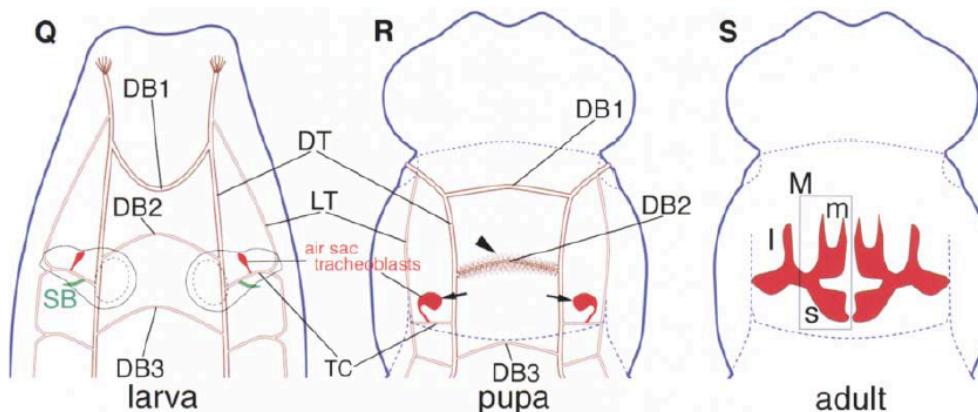


Figura 7. Dibuix sobre la formació de sacs d'aire toràcics en la larva, la pupa i l'adult. En vermell, els sacs d'aire i els traqueoblasts. En verd, les espiraculars. (Sato et al, 2002)

En aquest treball de recerca es pretén identificar nous gens implicats en el desenvolupament i remodelació de les tràquees de *Drosophila melanogaster*. Així podrem entendre millor els processos de tubulogènesis que es produeixen no només en la formació de les tràquees sinó també en la formació del pulmó o els vasos sanguinis dels vertebrats.

La tècnica del Knock in consisteix en que mitjançant la recombinació homologa es substitueix una seqüència codificant d'un gen d'interès per una altra seqüència que conté una sèrie d'eines que permeten a posteriori integrar altres seqüències. Així amb aquesta tècnica es genera no només un mutant del gen d'interès, al eliminar total o parcialment la seqüència codificant del gen sinó també la integració en un locus específic d'una seqüència diana que permet a posteriori la reintegració de qualsevol altre gen o eina que es desitgi. D'aquesta manera es poden generar eines per a l'estudi de la funció de gens, com eines que permetin analitzar el patró d'expressió, generar proteïnes truncades, etc que son expressades sempre sota el control del promotor endogen del gen en qüestió. En aquest treball es descriuen els primers passos per generar un knock in en el locus del gen *bnl*

3. OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquest treball és estudiar els mecanismes que controlen el manteniment de les cèl·lules mare en la remodelació traqueal durant la metamorfosi de *Drosophila melanogaster*. Per aquest motiu es vol identificar nous gens que participin en la remodelació del sistema traqueal de *Drosophila melanogaster* durant la metamorfosi mitjançant un mini-cribratge de gens que s'expressen en la tràquea.

El segon objectiu és la generació d'eines per a l'estudi de la via de senyalització *FGF/Bnl* durant la remodelació del sistema traqueal mitjançant la tècnica de *knock in*.

4. MATERIALS

Les línies de mosques UASnocRNAi (CG4491 No ocelli), UASjarRNAi (CG5695 Jaguar), UASpeptisadeRNAi (CG4017 Peptidasa), UASMyo61FRNAi (CG9155 Myosin 61F), UASlarkRNAi (CG8597 Lark), UAStraf4RNAi (CG3048 TNF-receptor-associated factor 4), UASprotogeneRNAi (CG17098), UASckRNAi (CG7595 Crinkled), UASveinRNAi (CG10491 Vein) per a la realització del cribratge foren obtingudes del Vienna Drosophila Resource Center (<http://stockcenter.vdrc.at/control/main>).

Les següents línies de mosques es van obtenir de Bloomington Drosophila Stock Center at Indiana University (<http://flystocks.bio.indiana.edu>). *bt1gal4*, UASGFP, UASvein, *tubgal80ts*

Anticossos:

Per la realització de les tincions immunocitoquímiques es van utilitzar els següents anticossos primaris: AntiPH3 de conill (1:200) (Cell Signaling), AntiCaspasa de ratolí (1:500) i AntiBGalactosidasa de ratolí (Drosophila Hybridoma Bank). Els anticossos secundaris utilitzats foren Anti conill Alexa 555, Anti ratolí Alexa 555.

Primers:

Es van dissenyar uns primers per poder realitzar la amplificació mitjançant PCRs dels fragments d'interès.

F3'armS (forward): ACCCAG[*ACTAGT*]ACTTCAATAATTACTTGG

R3'armB (reverse): GGACTA[*AGATCT*]ATGTAAAGTACAACAGC

F5'armN (Forward) : ACTCAA[*GCGGCCGC*]AATTGGATTGTTTCTGC

R5'armk (reverse): TCAGCA[*GGTACC*]ACCACTTTGGTTCACAGG

Suport informàtic:

Base de dades de Gens i Genomes de *Drosophila melanogaster* (mod-ENCODE Tissue Expression Data) disponible on-line *FlyBase* (<http://flybase.org/>).

Vector destí: pTV-cherry (Baena-López et al, 2013).

5. METODOLOGIA I COS DEL TREBALL**5.1 SELECCIÓ GENS DE GENS CANDIDATS**

La selecció de gens candidats per a realitzar un cribatge funcional es va realitzar mitjançant el mod-ENCODE Tissue Expression Data disponible a la flybase (flybase.org). Aquesta base de dades conté l'expressió comparada dels RNA de tots els gens del genoma de *Drosophila* al llarg del desenvolupament i per teixits. Per identificar gens latament expressats en les tràquees vam usar les eines informàtiques disponibles en la mateixa base de dades.

Silenciament dels Gens candidats específicament al sistema traqueal de *Drosophila*

Els gens candidats foren silenciats específicament a les cèl·lules traqueals mitjançant la tècnica del RNAi i del sistema GAL4/UAS modulats temporalment pel sistema Gal80ts.

Tècnica de silenciament per RNAi

En el nucli cel·lular els gens transcriuen la informació genètica continguda en el seu ADN a ARN missatger (ARNm), aquest ARNm abandona el nucli i s'uneix al ribosoma de la cèl·lula, que tradueix la seqüència de ARNm a la corresponent proteïna. Aquesta traducció i síntesi proteica es pot bloquejar actuant sobre el ARNm, mitjançant l'anomenat silenciament del ARN. El silenciament de l'ARN és un mecanisme gènic regulador que limita el nivell de transcripció deguda a la degradació específica del ARN missatger (posttranscriptional gene silencing [PTGS]/RNA interference [RNAi]). El silenciament gènic per RNAi es induït per petites molècules de ARN bicatenari de 21 a 27 nucleòtids denominades siRNA (small interfering RNA). Aquests siRNA pateixen una sèrie de processos a la cèl·lula que com conseqüència el seu ARN de doble cadena es desplega en una cadena sentit i una cadena antisentit. La cadena antisentit s'uneix a la cadena ARNm de manera específica per complementarietat de bases, provocant que el complex resultant sigui reconegut per mecanismes cel·lulars i degradat. (N.Agrawal, 2003)

Cada siRNA és altament específic per la seqüència de nucleòtids diana al que degrada. Això es produeix naturalment en l'organisme de *Drosophila melanogaster* però també poden ser introduïts artificialment en l'organisme amb el fi de silenciar un gen específic utilitzant el sistema Gal4/UAS.

El sistema Gal4/UAS

El sistema UAS-Gal4 es un sistema genètic que permet l'expressió específica d'un gen determinat. Aquest sistema consisteix de dues parts, el gen Gal4, que codifica per la proteïna activadora de la transcripció Gal4 de llevat i la regió UAS (Upstream Activation Sequence) que és un enhancer on s'hi uneix el Gal4 específicament activant la transcripció. A *Drosophila* les línies Gal4 estan controlades per un promotor d'un gen natiu i se'ls anomena drivers perquè permeten l'expressió del Gal4 en el patró d'expressió del gen d'interès. Aquest fet ha permès l'expressió de Gal4 seguint un patró molt general (constitutiú, teixit muscular...) o molt específic (connexions sinàptiques d'unes neurones determinades) depenen de la zona reguladora. És important remarcar que aquestes línies portadores del gen Gal4 no presenten cap fenotip ja que la proteïna GAL4 de llevat no té cap efecte. D'altra banda existeixen les línies reporteres. Aquestes són línies de *Drosophila melanogaster* que presenten la regió UAS upstream d'un gen d'interès (target gene). La inserció d'aquests elements al genoma tampoc té cap efecte ja que el genoma de *Drosophila* no conté el gen Gal4 de llevat. Per tant el target gene estarà silenciàt. Per conduir l'expressió del gen d'interès a un teixit determinat, s'han de creuar mosques de la línia Gal4 del teixit que volem estudiar (en el nostre cas la tràquea) i mosques de la línia reportera. D'aquesta manera en la descendència i en la tràquea d'aquesta mosca s'expressarà el gen Gal4, el qual s'unirà a la regió UAS i activant l'expressió del gen d'interès. El sistema UAS-Gal4 és una de les metodologies que va revolucionar la investigació amb *Drosophila melanogaster* ja que permet tant la sobreexpressió de gens concrets com la reducció de la seva expressió, utilitzant la tècnica d'interferència del ARN abans explicada. (Brand et al. 1993, Jennerdell et al. 2000).

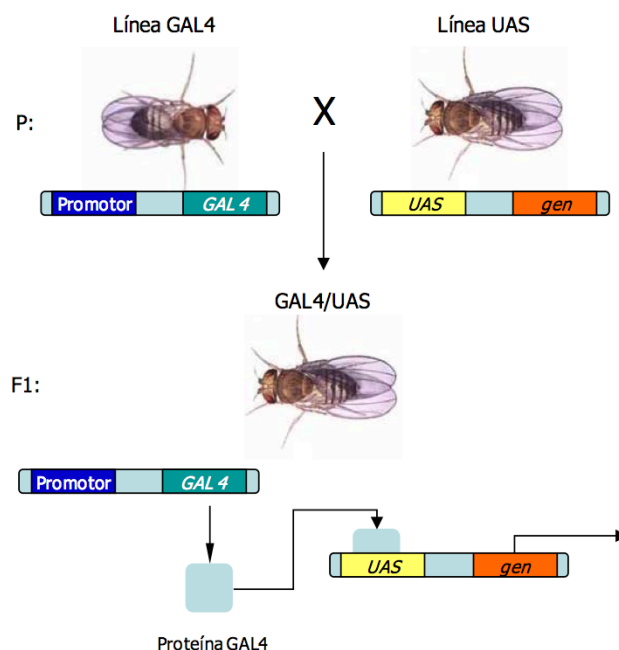


Figura 8. Esquema del sistema UAS/GAL4. Les cepes GAL4 expressen la proteïna segons un patró determinat. La cepa UAS és incapaç d'expressar per ella mateixa el gen d'interès. En la descendència del creuament de les dues la proteïna Gal 4 activa la expressió de la construcció UAS amb el patró propi del promotor utilitzat.

El sistema Gal80ts

El sistema Gal80ts inactiva el sistema UAS/Gal4 quan la temperatura és de 18°C o inferior i per tant, s'evita el silenciament del gen. El gen Gal80 codifica per a una proteïna de llevat que competeix amb la proteïna GAL4 per la seva unió a la seqüència reguladora UAS. Així quan el Gal80 es present impedeix que la proteïna Gal4 s'uneixi a l'UAS impedit l'expressió del gen que controla aquesta seqüència. Existeixen mutants del Gal80 que son termosensibles, es a dir que es comporten de manera diferent depenent de la temperatura. Així el GAL80ts a temperatura permissiva de 18C es funcional i actua com a repressor del UAS mentre que a temperatura restrictiva de 29c deixa de ser funcional. Així doncs, només variant la temperatura podem controlar en el temps el funcionament del sistema UAS/Gal4 i per tant podem dirigir l'expressió del gen no només en un lloc determinat sinó també en un moment adequat. (McGuire et al, 2004).

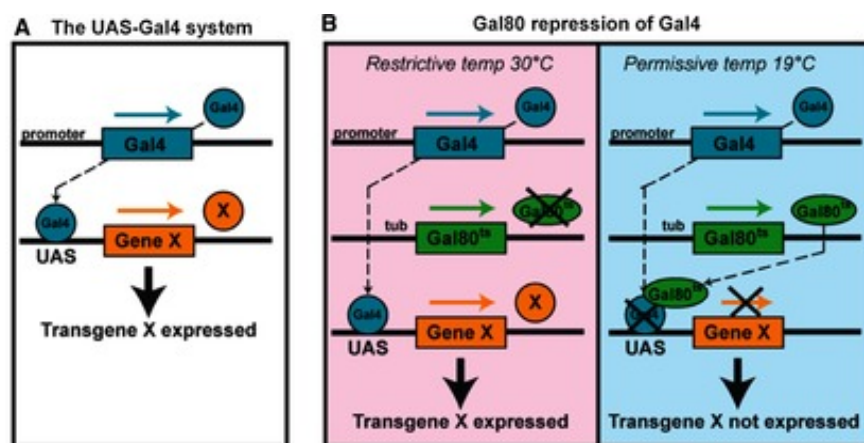


Figura 9: Control del sistema UAS/GAL4 mitjançant Gal80ts en 30°C i 19°C.

5.2 SELECCIÓ DELS CREUAMENTS.

Creuaments.

Femelles verges portadores del driver específic de tràquees *btlgal4UASGFP*; *TubGAL80ts* foren creuades amb mascles de les línies RNAi portadors de cadascun dels gens seleccionats prèviament a partir de la base de dades. Els embrions fruit d'aquest creuament es van mantenir a 18°C per tal que el GAL80 eviti el silenciament del gen en qüestió durant l'embriogènesi. Després de 3 dies les larves resultants van ser incubades a 29°C durant 2 dies per desactivar el GAL80 i permetre així el silenciament del gen d'interès. A continuació es va procedir a la dissecció de les tràquees larvals i a la seva fixació per preservar-ne la seva

integritat. Seguidament es van montar les traquees en un portaobjectes amb un medi de muntatge Vectashield, que evita la pèrdua de fluorescència de les mostres i que a més conté DAPI, un fluorocrom que s'uneix i marca el DNA. Els fenotips dels creuaments van ser observats en un microscopi de fluorescència Zeiss.

Creuaments gen vein

Femelles verges *bt1gal4uasGFP* es van creuar amb mascles *veinlacZ*. Les larves resultants del creuament van ser dissecionades a diferents estadis de creixement (L3- early, L3- mid i L3 late) i es va observar el desenvolupament del sac aeri del disc imaginal d'ala en cada un d'ells.

Les femelles verges es van creuar amb mascles *UASVeinRNAi* per tal de silenciar el gen *Vein* i amb mascles *UASVein*, per sobreexpressar el gen *Vein*.

Finalment es van creuar femelles verges amb mascles *UASVeinRNAi;UASp35*.

Immunocitoquímica

Les larves L3-late es van dissecionar i es van fixar amb formaldehid al 4%. Les mostres amb GFP van ser muntades sense cap altra manipulació. En canvi a d'altres mostres es van fer rentats amb PBS-Tritó 0,1% de 10 minuts i es va afegir el anticòs primari corresponent. Es va deixar incubant a 4°C durant tota la nit tapat amb paper d'alumini. A continuació es van tornar a fer rentats amb PBS-Tritó 0,1%. Després es va afegir el anticòs secundari marcat amb fluorocroms i es va incubar 1 hora i mitja a temperatura ambient. Es van fer tres rentats amb PBS-tritó 0,1% i es va procedir al muntatge de les tràquees al portaobjectes amb el medi de muntatge Vectashiel amb DAPI. Les mostres foren analitzades i digitalitzades amb el microscopi de fluorescència Zeiss o amb el confocal Leica SP5 del servei de microscòpia del PRBB.

5.3 GENERACIÓ D'UN KNOCK OUT/ KNOCK IN DEL GEN BNL.

Per poder dur a terme el Knock out del gen *Bnl*, es van dissenyar primers per tal d'amplificar mitjançant PCR, aproximadament 1Kb de la zona 5' i 3' que flanqueja l'últim exò del gen *bnl* (Figura 11).

Els primers per amplificar les regions 3' i 5' de l'exó 2 del gen *Bnl* a partir d'una mostra de DNA genòmic extret d'una mosca WT:

Cada un dels primers conté una seqüència que serveix de diana per tallar amb diferents enzims de restricció deixant extrems cohesius (marcat en els primers entre parèntesi) per al seu posterior clonatge en el vector pTV-Cherry. En el cas de la regió 3' els encims són *Bgl*III i *Spe*I i en la regió 5' *Not*I i *Kpn*II.

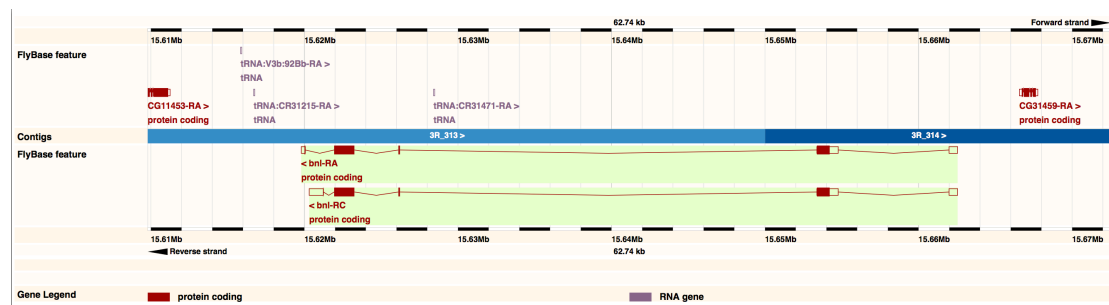


Figura 10. Esquema de l'exò 2 de Bnl.

ExtraccióDNA genòmic

Es van posar 10 mosques WT femelles en un eppendorf amb Buffer A i se li va afegir Buffer B, proteïnasa K per la digestió de la proteïna i es va incubar durant dues hores a 37°C. A mitja incubació es va afegir més proteïnasa K. Posteriorment es va fer un short per evitar la condensació. S'hi va afegir fenol per tal de separar en fases la mostra i es va centrifugar a la màxima revolució durant 5 minuts. La separació per capes permet distingir el sobrenedant de la resta que està diferenciada per un tel. Després d'extraure el sobrenedant se li van afegir dos volums d'etanol 100% i es va congelar. Un cop congelat, es va centrifugar a 4°C durant 4 minuts a 13.000 rpm i després es va eliminar el sobrenedant. Seguidament es va afegir etanol 70%, es va resuspendre i es va centrifugar 4 minuts més a 4°C i a 13.000rpm. Es va eliminar el sobrenedant i es va deixar secar a temperatura ambient per tal d'eliminar tot el etanol. Es va resuspendre amb TE i es va deixar reposar a la nevera o.n. Finalment es va addicionar RNAasa i es va resuspendre 30 minuts a 37°C.

PCRs

Per realitzar la PCR en dos eppendorfs diferents es va posar a cada un d'ells 1 microlitre de l'extracció de genòmic, un microlitre de cada un dels primers (forward i reverse), 0,4 microlitres de la Taq Polimerasa, 2 de Magnesi i 2 de dNTPs i 5 de buffer de PCR. El resultant fins a 50 microlitres va ser d'aigua milli-Q (37,6 microlitres).

El programa utilitzat va ser:

- Step 1→5 minuts a 98°C
- Step 2→30 segons a 98°C
- Step 3→30 segons a 65°C
- Step 4→3 minuts a 68°C
- Step 5→Tornar al step 2, 35 cicles.
- Step 6→ 10 minuts a 72°C
- Manteniment a 14 °C (es pot deixar o.n.)

Un cop realitzada l'amplificació dels fragments que nosaltres volíem, es va fer córrer un gel mitjançant una electroforesi per tal de comprovar que la PCR hagués funcionat i que s'ha amplificar el fragment que té la mida que nosaltres volem. Es van tallar les bandes corresponents al fragments i es van congelar per la posterior purificació.

Es va fer una precipitació del producte de PCR i de les bandes tallades del gel d'electroforesi amb acetat sòdic i etanol fred. Es va centrifugar 20 minuts a una temperatura de 4°C i es va rebutjar el sobrenedant. Es va afegir etanol 70% i es va tornar a centrifugar 5 minuts a temperatura ambient. Es va descartar el sobrenedant i es va centrifugar 30 segons per extraure amb la pipeta el etanol. Es va deixar secar la mostra i es va resuspendre amb aigua miliqu.

Lligació amb el vector pGEM-T i transformació

Es va fer una lligació de cada un dels fragments clonats en el vector comercial pGEM-T de Promega (http://www.promega.es/products/pcr/pcr-cloning/pgem_t-vector-systems/) i posteriorment es va transformar amb IPTG i XGal per marcar les colònies de bacteris que inclouen el nostre fragment en una placa amb carbomicilina. Es van realitzar diferents Mini-Preps amb un protocol estàndard i es va comprovar mitjançant una digestió si contenien els fragments clonats. Els resultats positius de les Mini-Preps es van digerir amb els dos enzims (el fragment clonat corresponent a la regió 3' es va digerir amb SpeI i BglII i el fragment clonat corresponent a la regió 5' es va digerir amb NotI i KpnI). Finalment es va fer una precipitació amb acetat sòdic.

Clonació dirigida al vector de destí pTV-cherry

El vector pTV-cherry (Baena-López et. Al. 2013) es va cultivar en una placa i es van realitzar Mini-Preps amb protocol estàndard. El vector pTV-Cherry té dues regions multicloning site que contenen les dianes per els enzims de restricció dels fragments clonats. A més a més aquest vector té un gen de resistència a ampicil·lina, una cua Cherry poli A i el gen mini-white, que donarà un color d'ull blanc les mosques i permetrà identificar els transgènics a cop d'ull. El vector destí es va digerir per separat amb els enzims (primer i SpeI i BglII i després NotI i kpnI) i es van fer les lligacions amb els fragments clonats un a un.

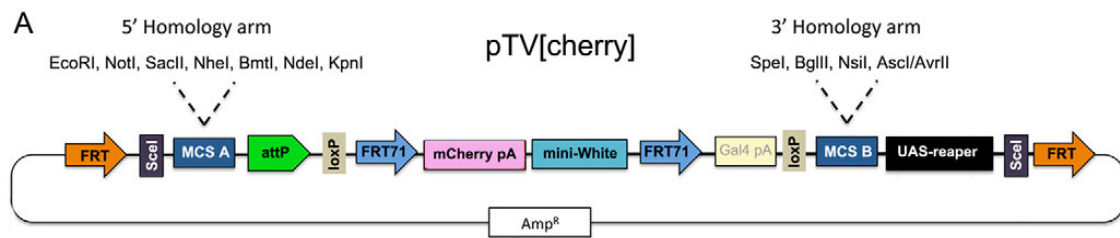


Figura 11: Esquema del vector pTVCherry. Aquest vector té un gen de resistència a ampicil·lina, una cua poli A i el gen mini white.

6. RESULTATS I DISCUSSIÓ

6.1 MINI-CRIBATGE DE GENS SOBREEXPRESATS A LA TRÀQUEA PER IDENTIFICAR AQUELLS QUE PARTICIPIN EN LA REMODELACIÓ DEL SISTEMA TRAQUEAL DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Per tal d'identificar nous gens implicats en el procés de remodelació del sistema traqueal de *Drosophila* es van utilitzar les eines i dades emmagatzemades a la Base de dades de Gens i Genomes de *Drosophila melanogaster* (*mod-ENCODE Tissue Expression Data*) disponible on-line *FlyBase* (<http://flybase.org/>). Usant aquestes dades vam identificar 10 gens amb alta expressió a les tràquees larvals comparat amb la seva expressió en altres teixits. (Figura 12)

A continuació aquests deu gens van ser silenciats mantjant l'expressió del seu corresponent RNAi sota el control del driver *btlgal4UASGFP* específic de les tràquees. El fenotip resultant va ser visualitzat pel GFP que marca les cèl·lules traqueals i el DAPI els seus nuclis. Dels 10 gens candidats 4 van presentar algun tipus de fenotip en la tràquea. A continuació s'analitza els fenotips d'aquests mutants .

El silenciament del *gen CG17098*, en el sistema traqueal produeix defectes en la formació del sac aeri. (Figura 13). El sac aeri presenta una forma aberrant i sembla tenir menys cèl·lules que el control . El *gen CG17098* codifica per a un factor de transcripció de funció desconeguda

El silenciament del *gen CG4017* específicament al sistema traqueal que codifica per a una peptidasa presenta un fenotip completament diferent al cas anterior. En aquest cas el sac aeri es molt més gran que el control i amb un número de cèl·lules també més gran.(Figura 13).

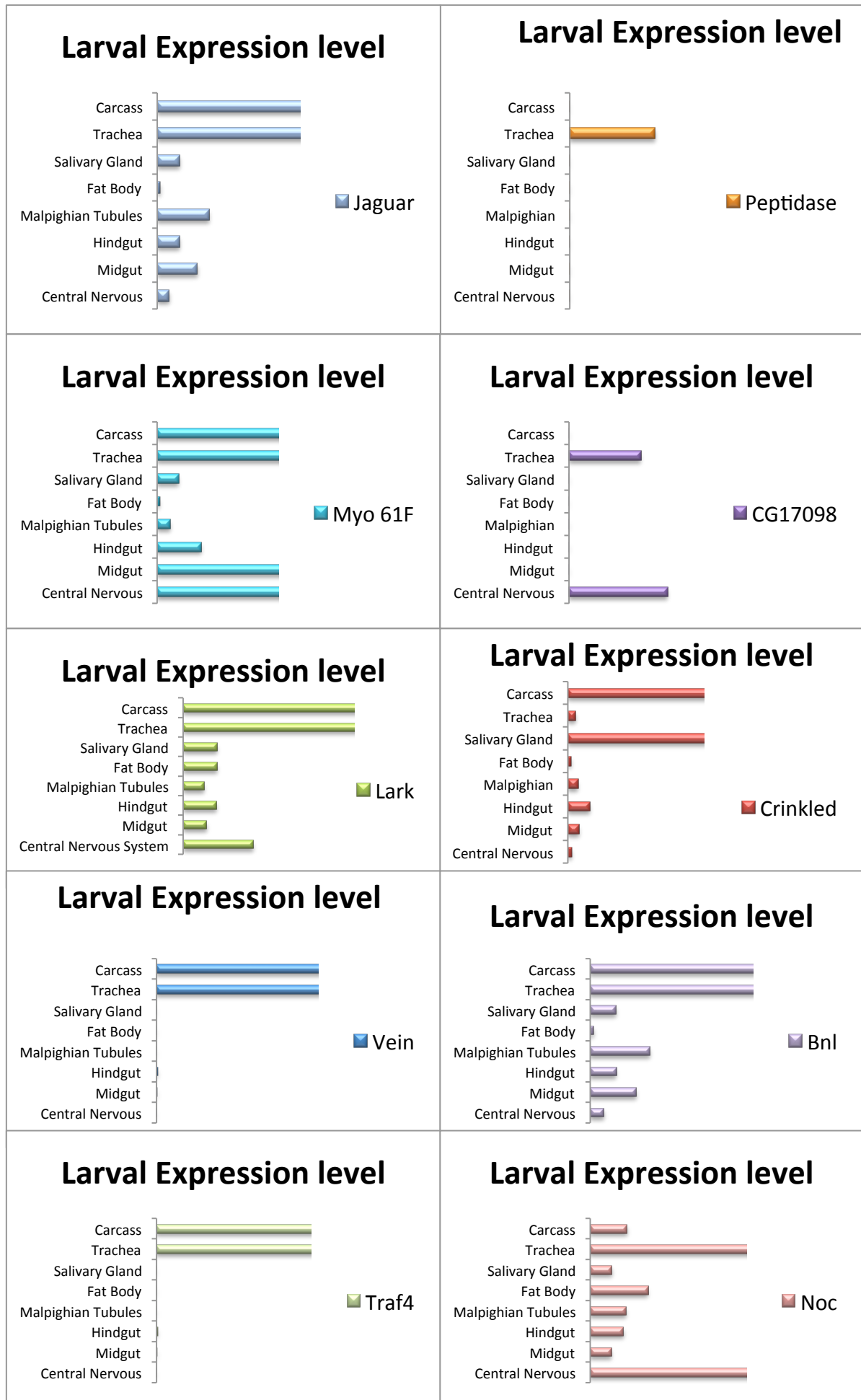


Figura 12: Nivell d'expressió en diferents teixits dels gens seleccionats a flybase.org

El gen *CG4491 No Ocelli* codifica per un factor de transcripció amb dit de zinc. Els mutants presenten un fenotip en el que el sac no està ben desenvolupat (Figura 13). A més a més observem que les branques espiraculares no tenen l'acumulació de les cèl·lules traqueals que faran possible la formació de la tràquea pupal durant la metamorfosi i les cèl·lules del TR2 tampoc es divideixen (figura 14).

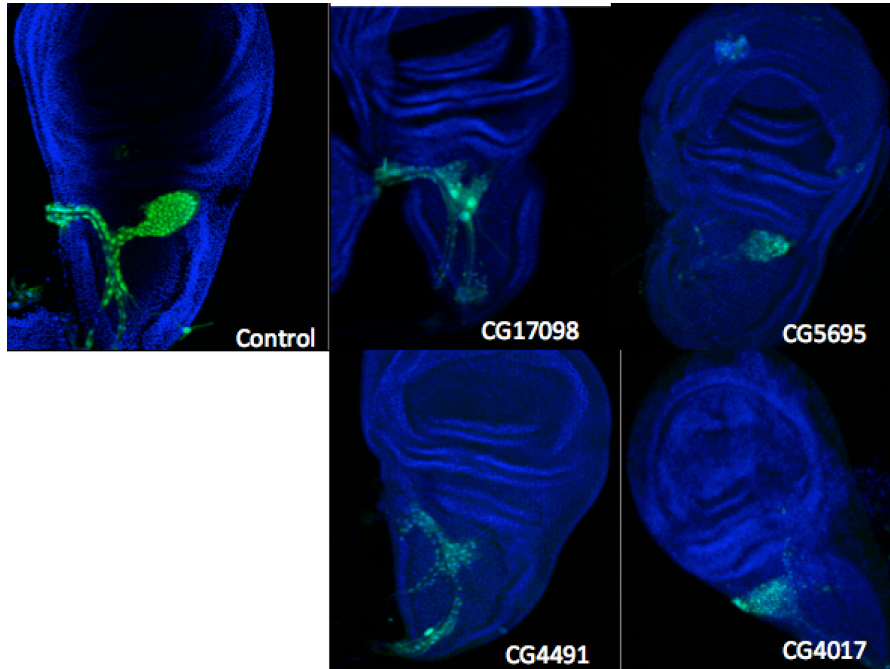


Figura 13. Malformacions del sac del disc imaginal d'ala en *Drosophila melanogaster*. Els discs imaginals de l'ala van ser revelats sota l'expressió de btlGal-UASGFP en estadi L3-late i els reporters UASnGFP (CG4491 No ocelli), UASjarRNAi (CG5695 Jaguar), UAStraf4RNAi (CG3048 TNF-receptor-associated factor 4) i UASprotogeneRNAi (CG17098).

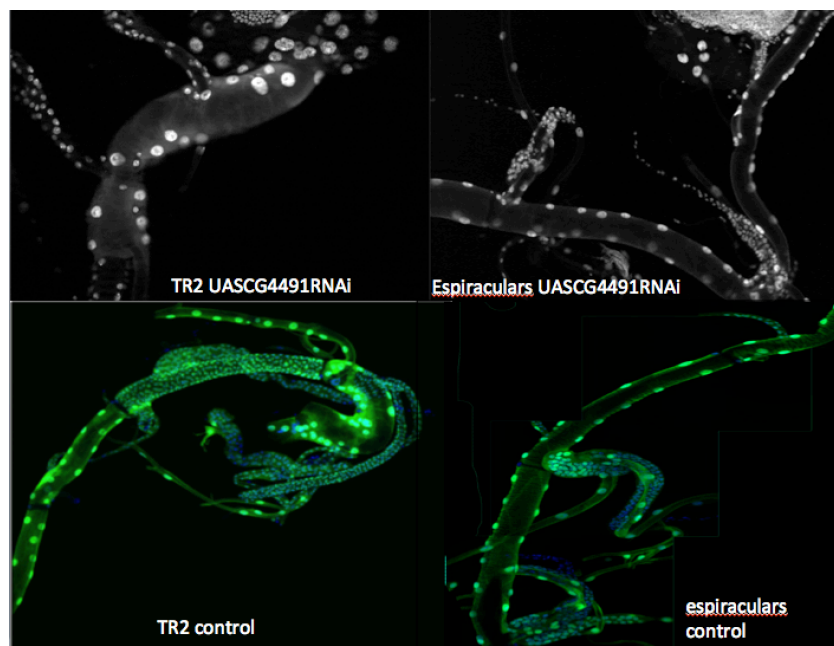


Figura 13. Spiraculars i TR2 sense divisió en silenciament del *CG4491*RNAi.

Finalment el silenciament del gen *Vein*, al sistema traqueal impedeix la formació del sac aeri (Figura 14B). *Vein* codifica per un dels lligands de la via de senyalització Epidermal Growth Factor (EGF) ref. La via EGF està implicada en molts processos durant el desenvolupament. (Schenepp et. Al 1996) Per comprovar si la via d'EGF té alguna funció en la formació del sac aeri es va comprovar si *Vein* s'expressava al sistema traqueal. Per a realitzar aquest experiment es van combinar el reporter *VeinLacZ* que mostra l'expressió del gen *Vein* amb *btGal4UASGFP* que permet la visualització de les tràquees. Utilitzant aquestes eines es va veure que *Vein* s'expressava al sac aeri des de principis de L3 (L3 early) fins a finals de L3 (L3 late) (Figura 14A).

Per estudiar el possible paper de *Vein* en el desenvolupament del sac aeri es va sobreexpressar la línia *UASVeinRNAi* (que silencia el gen *Vein*) sota el control de *btGal4UASGFP*. En aquestes condicions el sac aeri presenta un nombre de cèl·lules inferior al control i una morfologia cel·lular, visualitzada amb un marcador de membrana, aberrant. En canvi quan es va sobreexpressar la proteïna *Vein* amb la línia *UASVein* el sac presenta un nombre de cèl·lules major, amb un excés de cèl·lules.

Aquest resultat suggereixen que *Vein* i per tant la via de senyalització EGF prevén l'apoptosi i promou la divisió cel·lular i en el sac aeri del disc imagnal de *Drosophila melanogaster* (Figura 14B)

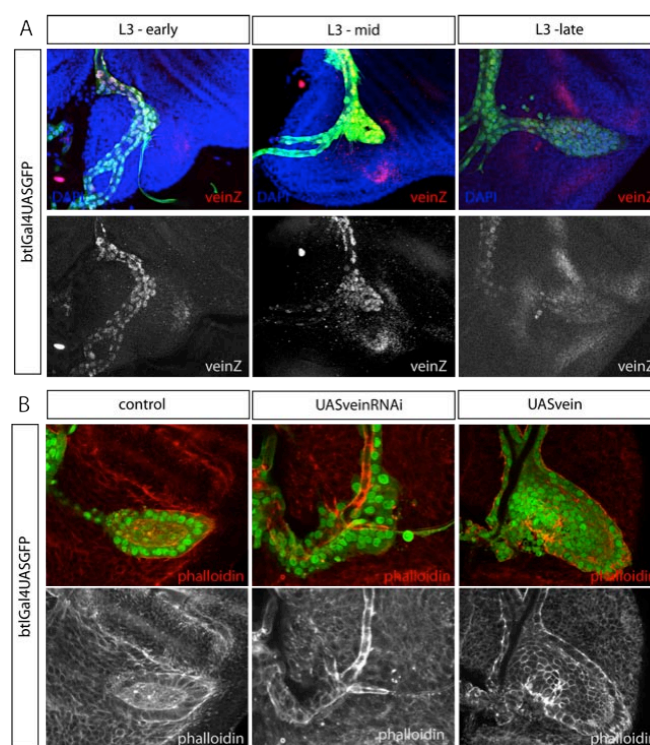


Figura 14: Control del desenvolupament del sac pel gen *Vein*. A dalt, es mostra el desenvolupament del sac aeri del disc imagnal d'ala en diferents estadis de creixement de la larva (A) combinant el reporter *VeinLacZ* que mostra l'expressió del gen *Vein* amb *btGal4UASGFP*. A Baix estudi de la funció funció de *Vein* en el sac utilitzant *btGal4UASGFP* amb la línia *UASVeinRNAi* (que silencia el gen *Vein*) i la línia

UASVein (que sobreexpressa el gen Vein). La fal·loïdina (Phalloidin) marcada amb un fluorocrom tenyeix les membranes.

Per demostrar aquesta hipotesi es van utilitzar marcadors específics d'apoptosi (caspasa) i proliferació (Histona fosforilada PH3) en diversos fons mutants. En els sacs aeris on vein va ser silenciada, no es va detectar cap cel·lula marcada amb PH3, en canvi es van observar cèl·lules marcades amb caspasa. Coherentment, en sacs aeris on Vein fou sobreexpressat no es va detectar caspasa però sí es va observar un increment significatiu de cel·lules traqueals marcades amb PH3 (Figura 15A). Finalment per confirmar que vein no només activa la proliferació sinó també la supervivència cel·lular es va sobreexpressar la proteïna vírica que atura l'apoptosi P35, en cel·lules traqueals que tenien silenciada el gen Vein. En aquestes condicions el sac aeri va ser rescatat parcialment (Figura 15A).

Aquests resultats demostren que Vein i per tant la via EGF, a més de promoure proliferació cel·lular en el sac aeri també permet la supervivència cel·lular, és a dir que inhibeix l'apoptosi en el sac del disc imaginal de l'ala de *Drosophila melanogaster* (Figura 15B).

Això ens fa pensar que el gen Vein activa la proliferació cel·lular i inhibeix l'apoptosi en el sac del disc imaginal de l'ala de *Drosophila melanogaster*.

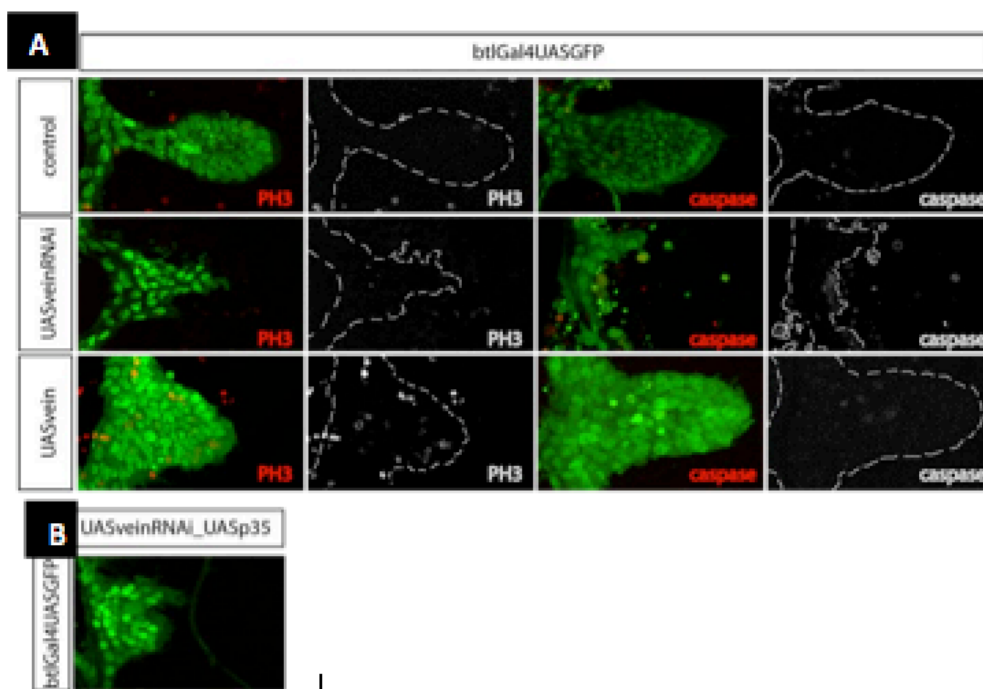


Figura 15: Control de la proliferació i l'apoptosi de les cèl·lules del sac aeri del disc imaginal de l'ala del gen Vein. A dalt, creuament amb mascles UASVeinRNAi i UASVein amb els marcadors PH3 que permet veure la divisió cel·lular i caspase que és un marcador d'apoptosi. (A). A baix, creuament amb mascles UASVeinRNAi;UASp35 (B). La proteïna P35 és una proteïna vírica que atura l'apoptosi.

6.2. GENERACIÓ D'EINES PER A L'ESTUDI DE LA VIA DE SENYALITZACIÓ *FGF/BNL* DURANT LA REMODELACIÓ DEL SISTEMA TRAQUEAL MITJANÇANT LA TÈCNICA DE *KNOCK IN*

Per analitzar la funció del gen *Bnl* i per tant de la via de senyalització *FGF/Bnl* en la remodelació de la traquea durant la metamorfosi vam dissenyar i iniciar la generació d'un knock in al gen *Bnl*. Per poder generar el *knock in* es va amplificar aproximadament 1KB, per PCR de les regions flanquejants 3' i 5' de l'exó 3 del gen *Bnl* a partir d'una mostra de DNA genòmic extret d'una mosca WT. Els resultats es mostren a la Figura 16: podem veure les dues bandes corresponents als fragments amplificats

Es van dur a terme diferents PCRs amb els primers dissenyats a partir d'una mostra de DNA genòmic extret d'una mosca WT per tal de generar un knock out per l'estudi de la via de senyalització *FGF/Bnl* durant la remodelació del sistema traqueal. Els resultats mostren la banda dels fragments d'un pes aproximat d'1Kb corresponents a les regions 3' i 5' de l'exó 2 del gen *Bnl*.

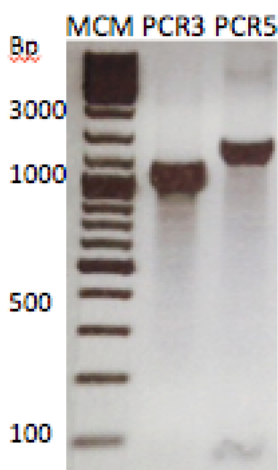


Figura 16. Clonació dels fragments mitjançant la tècnica de la PCR. Es mostren les bandes obtingudes corresponents als fragments clonats d'1 Kb de pes aproximat.

A continuació els fragments es van clonar en el vector pGEM-T i una transformació en una placa amb carbomicilina. Es van realitzar Mini-Preps de les colònies blanques i es va digerir per comprovar aquelles que havien acoblat els nostres fragments. Els resultats mostren les bandes corresponents als fragments i al plàsmid digerits amb l'enzim de restricció *EcoRI* que allibera el fragment clonat. Les bandes del carril 1-5 són les Mini-Preps dels fragments 3' i els carrils 5-10 mostren els resultats de les miniPreps dels fragments 5'. Es van trobar resultats positius en els carrils 1, 3, 5, 6 i 8.

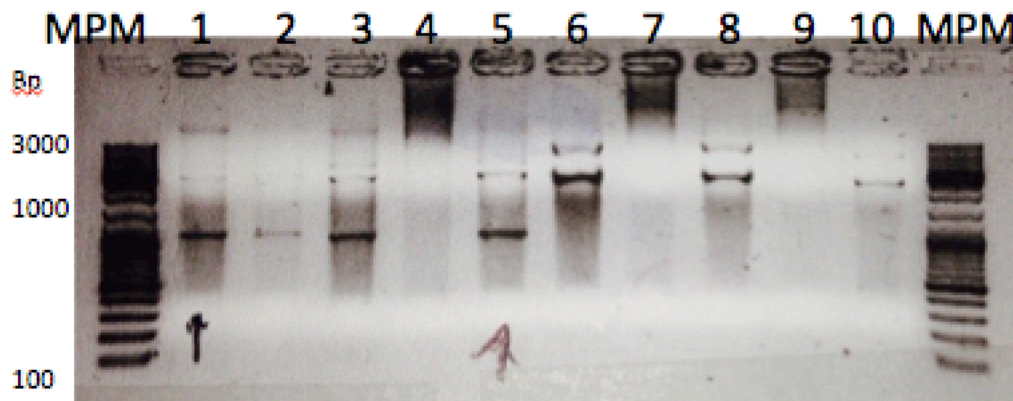


Figura 17. Mini-Preps resultats de la transformació dels fragments clonats. Es pot veure la banda característica del vector pGEM-t i les bandes corresponents als dos fragments amplificats amb les PCRs

Seguidament es van fer dobles digestions amb BglII, SpeI per al fragment 5' i NotI i KpnI per al fragment 3' per al seu clonatge en el plàsmid p-TVcherry. Els fragments alliberats van ser purificats i precipitats

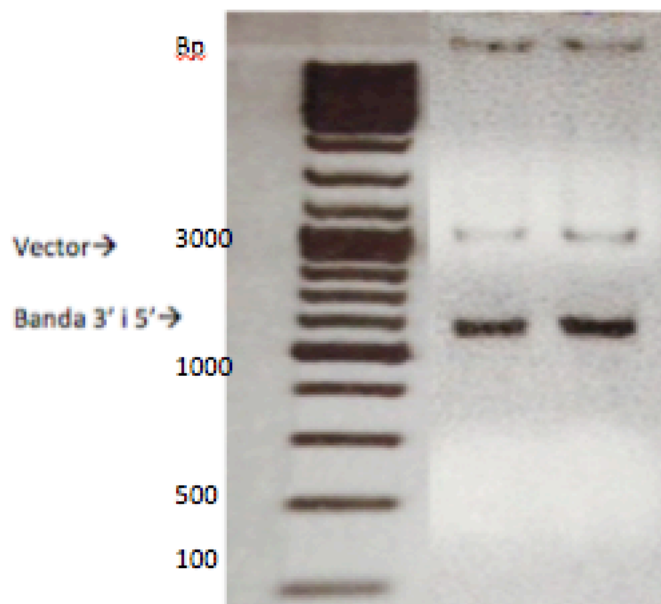


Figura 18. Digestió doble amb els enzims BglII, SpeI, NotI i KpnI. A l'esquerra, marcador de pes molecular, al mig, banda corresponent al plàsmid pGEM-T tallat i al fragment 3' digerit amb BglII i SpeI. A la dreta banda corresponent al plàsmid pGEM-T i al fragment 5' digerit amb NotI i KpnI

Al mateix temps es va digerir el vector de destí pTV-cherry digerint amb els enzims SpeI i BglII per tal de clonar el fragment 3'.

Per motius de temps aquest projecte s'ha hagut de finalitzar en aquest punt per a aquest treball. Tanmateix serà finalitzat en el laboratori seguint els següents passos.

Després de la clonació del fragment 3' es procedirà al clonatge del fragment 5'. Per dur a terme aquest clonatge es digerirà el plasmid pTV-cherry amb NotI i KpnI i es lligarà amb el fragment també digerit amb els mateixos enzims. Després de comprovar el clonatge es procedirà a la seva injecció en embrions de *Drosophila* a la unitat de transgènics del Institut de recerca Biomèdica del Parc Científic de Barcelona.

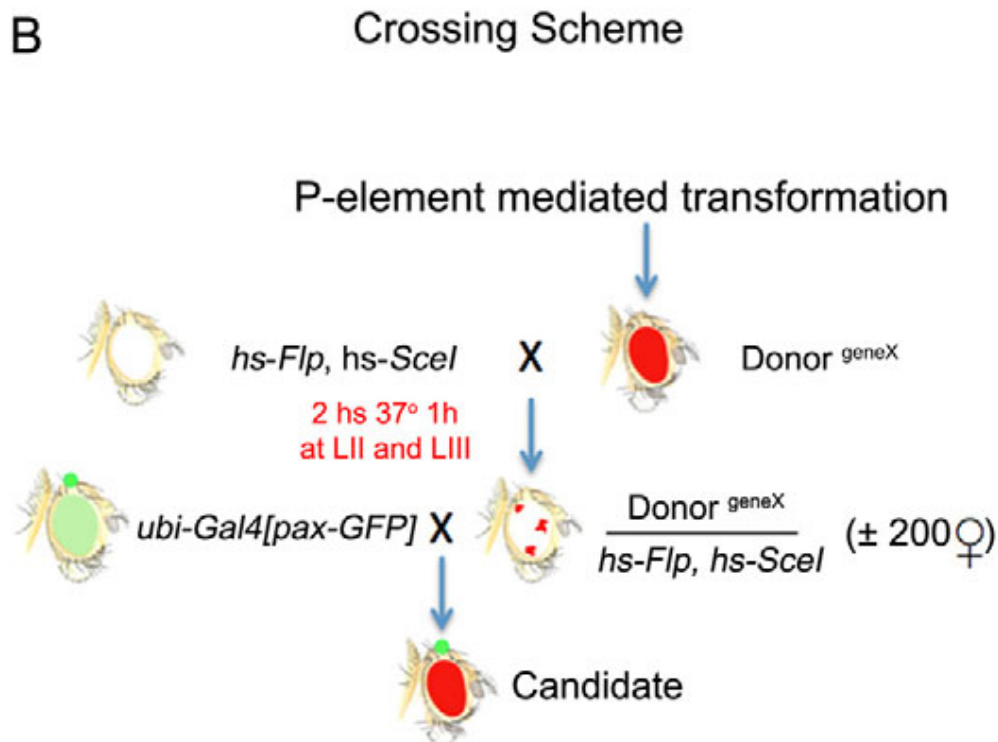


Figura 19. .Gene targeting by crossing scheme. L'element P transformat es va utilitzar per generar la cadena donant, que porta el vector pTVCherry amb el gen Bnl en una localització a l'atzar al genoma.

Un cop generat la línia transgènica portadora del nostre plàsmid aquestes mosques es creuen amb una línia de mosques portadores de l'enzim Flipasa i Sce-1 sota el control d'un promotor induïble per temperatura (hs) que mobilitzarà i linealitzarà la construcció. 200 femelles amb ulls puntejats de color vermell (indicació que porten el vector, la flipasa i SceI) es creuen amb mascles portadors d'un driver ubíquo ubiquitin-Gal4 i un marcador d'ulls [3xP3-GFP] per eliminar falsos positius. Finalment la progènie del segon creuament amb ulls vermells i fluorescents seran els putatius candidats.

7. CONCLUSIONS

- El mini-cribatge realitzat per seleccionar gens candidats mitjançant el mod-ENCODE Tissue Expression Data disponible a la flybase ha sigut molt útil per descobrir nous gens implicats en el desenvolupament traqueal.
- El sistema btlGal4UASGFP junt amb el sistema tubGal80ts han sigut molt útil per poder controlar en l'espai i el temps el silenciament dels gens candidats.
- El silenciament del gen CG17098 ha demostrat que aquest gen que codifica per un factor de transcripció desconegut té efectes en la formació del sac aeri del disc imaginal d'ala de *Drosophila melanogaster*.
- El silenciament del gen CG4017 Peptidasa demostra que aquest gen té un paper important en la formació del sac del disc imaginal d'ala de *Drosophila*.
- El gen *CG4491 No Ocelli* està implicat en la proliferació de les cèl·lules de les branques espiraculars i del sac del disc imaginal de l'ala com ha demostrat el seu silenciament.
- El gen *CG10491 Vein* promou la divisió cel·lular en el sac aeri del disc imaginal de *Drosophila melanogaster*.
- L'ús de les línies sobreexpressives i de silenciament de *Vein* junt amb els marcadors PH3 i caspase ens han ajudat a comprovar que el gen *Vein* activa la proliferació cel·lular i la sobreexpressió de la proteïna vírica amb la línia de silenciament de *Vein* va demostrar que *Vein* i per tant la via EGF, a més de promoure proliferació cel·lular en el sac aeri també permet la supervivència cel·lular, és a dir que inhibeix l'apoptosi en el sac del disc imaginal de l'ala de *Drosophila melanogaster*.
- El disseny de primers efectuat per l'amplificació dels fragments corresponents a les regions 3' i 5' de l'exó 2 del gen *Bnl* ha sigut efectiu com demostren els resultats de les PCRs.
- La clonació al vector pGEM-T va resultar efectiva per realitzar la tècnica del knock out.
- Pot ser molt útil de cara a un futur seguir amb el estudi de la via de senyalització FGL/BNL mitjançant la tècnica de Knock in.

8. BIBLIOGRAFIA

- Grabrial A., Luschig, S., Metzstein, M. M. & Krasnow, M. A. Branching morphogenesis of the *Drosophila* tracheal system. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 623–647 (2003)
- L.A.Baena-López, C. Alexandre, A. Mitchell, L. Pasakarnis and J.P. Vincent at *Accelerated homologous recombination and subsequent genome modification in Drosophila*, (2013) the company of Biologists Ltd 140, 4818-4825 Doi: 10.1242/dev.100933
- Pitsouli, C. & Perrimon, N. Embryonic multipotent progenitors remodel the *Drosophila* airways during metamorphosis. *Development* **137**, 3615–3624 (2010)
- E. Mcguire, Z. Mao, R. L. Davis, *Spatiotemporal gene expression targeting with the target and gene-switch systems in Drosophila*. sci. stke 2004, pl6 (2004). sci. stke, 17 february 2004 vol. 2004, issue 220, p. pl6 [doi: 10.1126/stke.2202004pl6
- Neema Agrawal, P.V.NDasaradhi, Asif Mohmmmed, Pawan Malhotra, Raj K. Bhatnagar and Sunil K. Mukherjee *RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications* Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003, 67(4):657. DOI: 10.1128/MMBR.67.4.657-685.2003.
- Sato et al. *FGF is an essential mitogen and chemoattractant for the air sacs of the Drosophila tracheal system*. *Developmental Cell*, Vol. 3. 195-207(2002). Doi: 10.1016/S1534-5807(02)00202-2
- Weasner BM1, Weasner B, Deyoung SM, Michaels SD, Kumar JP. , *Transcriptional activities of the Pax6 gene eyeless regulate tissue specificity of ectopic eye formation in Drosophila.*, *Dev Biol*. 2009 Oct 15;334(2):492-502. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.04.027. Epub 2009 May 4).
- Weaver, M. and Krasnow, M. A., Dual Origin of Tissue-Specific Progenitor Cells in *Drosophila* Tracheal Remodeling, *Science* 12 September 2008: 321 (5895), 1496-1499. Published online 31 July 2008
- E. mcguire, Z. mao, R. L. davis, *spatiotemporal gene expression targeting with the target and gene-switch systems in Drosophila*. sci. stke 2004, pl6 (2004). sci. stke, 17 february 2004 vol. 2004, issue 220, p. pl6 [doi: 10.1126/stke.2202004pl6

- P. Vincent at *Accelerated homologous recombination and subsequent genome modification in Drosophila*, (2013) the company of Biologists Ltd 140, 4818-4825 Doi: 10.1242/dev.100933)

9. ANNEXES

Creuament	Genotip Mascles	Característiques
1	CG4491 No ocelli	Funció d'unió a proteïnes. Participa en el desenvolupament del disc ull-antenal i el de la cama de la mosca i el disc d'ala.
2	CG5695 Jaguar	Morfogènesi dels discs imaginals, implicat en la metamorfosis, involucrat en el desenvolupament de la cutícula larval de la quitina i en el tancament dorsal durant l'embriogènesi.
3	CG4017 Peptidasa	Peptidasa M14 o carboxipeptidasa. Activitat proteolítica.
4	CG9155 Myo 61F	Involucrat en la determinació de la simetria vilateral de la mosca. Participa en el desenvolupament del mesoderm i en la morfogènesi dels genitals masculins derivats dels discs imaginals.
5	CG8597 Lark	Desenvolupament del embrió, ovegènesi, control del ritme circadià, del ritme locomotor i regulació negativa de l'eclusió.
6	CG3048 Traf4	TNF receptor associated factor 4 (Traf4). Implicat en el desenvolupament del ull, tancament del tòrax i fusió dels discs imaginals, desenvolupament del embrió.
7	CG17098	Cofidica per una proteïna que uneix acids nucleics.
8	CG7595 Crinkled	Desenvolupament dels òrgans sensorials, morfogènesi dels discos imaginals de l'ala que desenvolupen les estructures anatòmiques de les seves venes. Morfogènesi de les antenes. Formació del patró cuticular de la quitina larval.
9	CG4608 Bnl	També conegut com FGF(fibroblast growth factor). Té la funció d'unir el receptor FGF participant en diversos processos de diverses vies de senyalització implicades en desenvolupament del sistema traqueal, la seva estructura tubular i el procés de migració de les cèl·lules epitelials durant la formació de la tràquea.
10	CG 10491	Morfogènesi dels discos imaginals derivats de les ales. Participa en el desenvolupament del sistema nerviós perifèric de la mosca i del cervell. També participa en el desenvolupament del tracte digestiu de la mosca.
Taula 1. Creuaments generats.		

